

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 16, 1978, pp. 571–578

## Untersuchungen über die Chromozym TH-spaltende Aktivität von Humaserum

Von H. Keller, B. Keller und V. Wolf

*Institut für Klinische Chemie und Hämatologie des Kantons St. Gallen (Schweiz)*

(Eingegangen 10. April/26. Juni 1978)

*Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Staemmler zur Vollendung des 60. Lebensjahres gewidmet*

**Zusammenfassung:** Menschliche und tierische Seren spalten regelmäßig das chromogene Substrat Chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl)<sup>1</sup>). Dagegen wird es in der Regel von Citratplasma, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma, Urin und Liquor nicht gespalten. Bei der Untersuchung der zugrunde liegenden Ursachen zeigt sich, daß die Spaltungsgeschwindigkeit von Serum gesunder Blutspender oder von Patienten ohne Antikoagulantien-Behandlung in weiten Grenzen schwankt. Männer und Frauen zeigten keinen signifikanten Unterschied, bei den Patienten ergaben sich weder im Bereich der oberen oder unteren Extreme Häufungen von Diagnosen, Zuständen oder Symptomen. Bei Patienten unter Antikoagulantien-Behandlung ergab sich nur ein sehr grober Zusammenhang zwischen dem individuellen *Quick*-Wert im Citratplasma und der Spaltungsaktivität im Serum. Die individuelle Streuung von Tag zu Tag schwankte in einzelnen Fällen bis zum Achtfachen, wobei die Bedingungen der Blutentnahme offenbar von großem Einfluß auf die spätere Serumaktivität ist. Allerdings gelang es nicht, die Entnahmebedingungen so zu standardisieren, daß bei einzelnen Probanden bei wiederholten Blutentnahmen etwa gleiche Aktivitäten im Serum gefunden wurden. Die Chromozym TH-spaltende Aktivität im Serum ist wesentlich lagerungsstabiler als die von Humanthrombin, sie wird durch Heparin nicht gehemmt und kann durch Bariumsulfat oder Aluminiumhydroxid nicht adsorbiert werden. Seren mit hohen Chromozym TH-spaltenden Aktivitäten sind nicht in der Lage, Fibrinogen in Fibrin zu überführen. Bei der elektrophoretischen Trennung verhält sich die Chromozym TH-spaltende Aktivität im Serum deutlich unterschiedlich von Humanthrombin, ebenso ist ihre *Michaelis*-Konstante deutlich niedriger.

Durch Immunpräzipitation konnte festgestellt werden, daß es sich bei der Serumaktivität um einen Komplex aus Thrombin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin handelt.

### *Studies on the chromozyme TH-cleaving activity of human serum*

**Summary:** As a rule, human and animal sera cleave the chromogenic substrate TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl). On the other hand, it is not normally cleaved by citrate-plasma, EDTA-plasma, heparin-plasma, urine, or cerebrospinal fluid. During the investigation of the fundamental reasons for these differences, it was found that the cleavage rate by the serum of healthy blood donors, or patients without anticoagulant treatment, showed very wide variations. There was no significant difference between men and women. In the upper and lower extremes of cleavage activity in the blood of patients, there was no correlation with any diagnosis, condition, or symptoms. In patients treated with anticoagulants, there was only a very rough correlation between the coagulation value of the citrate-plasma and the cleaving activity in the serum. The individual variation from day to day showed a scatter that was as much as eight fold in individual cases. The conditions of blood sampling appeared to have a large influence on the serum activity, but it was never possible to obtain similar serum activities for different samples from one donor, simply by standardisation of the sampling procedure. The chromozyme TH-cleaving activity in the serum is more stable to storage than that of human thrombin; it is not inhibited by heparin, and it is not adsorbed by barium sulphate or aluminium hydroxide. Sera with high chromozyme TH-cleaving activities do not convert fibrinogen into fibrin. The electrophoretic behaviour of the chromozyme TH-cleaving activity is markedly different from that of human thrombin, and its *Michaelis* constant is much lower. By immunoprecipitation, it was shown that the chromozyme TH-cleaving activity is the property of a complex of thrombin and  $\alpha_2$ -macroglobulin.

<sup>1</sup>) Tos = Tosyl-, p-Tolylsulfonyl-  
pNA = p-Nitranilid  
Bz = Benzoyl-

Pip = Piperidiny-, 4-Aminobutyryl-  
Cbz = Carbobenzoxy-, Benzylloxycarbonyl-

## Einführung

Die von *Svendsen et al.* (1) erstmals synthetisierten chromogenen Substrate zur Bestimmung von Trypsin, Thrombin und Thrombin-ähnlichen Enzymen haben der experimentellen Untersuchung von Blutgerinnung und Fibrinolyse neue Möglichkeiten eröffnet: Während des Gerinnungsvorgangs wird von den als Substrat dienenden Oligopeptiden das Chromogen – in der Mehrzahl *p*-Nitroanilin – abgespalten, ein Prozeß, der photometrisch verfolgt werden kann. Von den Gerinnungsfaktoren können auf diesem Wege heute Faktor IIa (= Thrombin) (2, 3, 4, 5) und Faktor Xa (= Autoprotease C) (6, 7) direkt bestimmt werden. Aber auch für andere Serinproteasen (z. B. Plasmin (8), Kallikrein (9), Urokinase (10)) konnten chromogene Substrate synthetisiert werden, die eine unmittelbare Aktivitätsbestimmung erlauben.

Für zahlreiche andere Faktoren und Inhibitoren sind indirekte, auf diesem Prinzip basierende Verfahren beschrieben worden (11–20). Übersichten wurden unlängst auf einem von *I. Witt* (21) editierten Symposium gegeben, eine kurze Übersicht gibt *Duckert et al.* (22).

Wir haben beobachtet, daß Chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA · HCl)<sup>1)</sup> von menschlichen und tierischen Seren stets gespalten wird. Dabei sind die Hydrolysegeschwindigkeiten sehr unterschiedlich. Nicht gespalten wird Chromozym TH in der Regel von Citratplasma, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma, Urin und Liquor. Die unerwartete Beobachtung, daß nach dem *in vitro* abgelaufenen Gerinnungsprozeß im Serum regelmäßig eine relativ hohe Chromozym TH-Spaltungsaktivität meßbar ist, war Anlaß, dieses Phänomen näher zu untersuchen.

## Material und Methoden

### Untersuchungsmaterial

- Serum- und Plasma-Proben von Gesunden stammten entweder von Blutspender oder von Laborpersonal des Kantonsspitals St. Gallen.
- Für einige Fragestellungen wurden Plasmen und Seren von hospitalisierten Patienten mit bekannten klinischen Diagnosen dem Eingangsmaterial des Instituts entnommen.

### Chemikalien

- als chromogenes Substrat wurde Chromozym TH (Boehringer Mannheim, Bestellnummer 199 664), eingesetzt. Als Vergleichs-Substrate hatten wir die folgenden Verbindungen zur Verfügung:

KABI-Substrate (Globopharm AG, Küsnacht-Zürich):  
 S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)  
 S2160 (Bz-Phe-Val-Arg-pNA)<sup>1)</sup>  
 S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA)<sup>1)</sup>  
 S2222 (Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA)

Pentapharm-Substrate (Pentapharm AG, Basel):  
 Substrat für Plasmin (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA)<sup>1)</sup>  
 Substrat für Kallikrein (Bz-Pro-Phe-Arg-pNA)  
 Substrat für Trypsin (H-D-Val-Gly-Arg-pNA)  
 Versuchs-Substrat 1 (Bz-Arg-pNA)<sup>1)</sup>  
 Versuchs-Substrat 2 (Cbz-Gly-Pro-Arg-pNA)<sup>1)</sup>

- Aprotinin wurde in Form von Trasylol (Bayer, Leverkusen) verwendet, 14 mg  $\approx$  100 000 KIE.
- Als Thrombinpräparat (bovin) wurde „Test-Thrombin, standardisiert“, (Behringwerke, Bestellnummer RHT 19) verwendet.
- Für Vergleichszwecke wurde auch Thrombin (human) Calbiochem, (Humanthrombin) Bestellnummer 605/166, eingesetzt.
- Als Heparin-Präparat diente Liquemin (Firma Hoffmann-La Roche), 60 USP-Einheiten/ml.
- Antiseren: Anti-IgA-Serum vom Kaninchen und Anti-Transferrin-Serum vom Kaninchen wurde von der Firma DAKO-PATTS, Copenhagen (Vertretung Schweiz: READYSYSTEME AG, CH-8347 ZÜRZACH/AARGAU) bezogen. Alle übrigen eingesetzten Antiseren waren Handelspräparate der Behring AG.
- Triethanolamin-Puffer pH 8,4, Ionenstärke 0,6.
- Barbituratpuffer pH 7,6, Ionenstärke 0,5.

### Bestimmung der Spaltungsaktivität

Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, wurden zu 400  $\mu$ l Triethanolamin-Puffer 50  $\mu$ l Substratlösung (1,5 mmol/l) zugegeben und nach Erreichen der Reaktionstemperatur (+ 37° C) 20  $\mu$ l Probe zugemischt. Die Messungen erfolgten bei 405 nm mit einem Photometer Eppendorf und Absorptionsschreiber.

Der Gesamt-Ansatz enthält somit 0,075  $\mu$ mol Chromozym TH, die Endkonzentration an Substrat entspricht etwa 160  $\mu$ mol/l, liegt also weit oberhalb der bisher beschriebenen *Michaelis*-Konstante von Humanthrombin gegenüber Chromozym TH (36).

Die Aktivität wurde in U/l in folgender Weise berechnet:  
 $\Delta A_{405}/\text{min} \cdot 2260 = \text{U/l}$ , wobei ein  $A_{405}$  für *p*-Nitroanilin von 10400 mol<sup>-1</sup> · l<sup>-1</sup> · cm bei den gegebenen Reaktionsbedingungen angenommen wurde.

### Elektrophoretische Trennung der enzymatischen Aktivitäten

Als Träger wurde ein kommerzieller Agarosegel-Film verwendet (Protifilm-HR, READYSYSTEME AG, CH 8347 ZÜRZACH/AARGAU). Als Puffer diente Barbituratpuffer pH 8,6, Ionenstärke 0,075, die Laufstrecke betrug 70 mm. Die Spannung wurde während des Trennvorgangs so variiert, daß zunächst 30 min 14 Watt, dann 60 min 9 Watt, danach 30 min 7 Watt resultierten. Als Trennkammer diente die LKB-Elektrophoresekammer Multiphor, die Temperatur während der Trennung betrug + 4° C.

Es wurden jeweils etwa 1  $\mu$ l Material auf das Agarosegel aufgebracht.

### Visualisierung der enzymatischen Aktivitäten

Nach der Trennung wurde das Agarosegel auf eine Glasplatte gelegt, mit 5 ml Substratlösung (1,5 mmol/l) überschichtet und 30 min in einer feuchten Kammer bei + 37° C inkubiert. Danach war die Substratlösung vom Agarosegel weitgehend aufgesaugt, die Protease-Aktivitäten konnten als schwachgelbe Flecken erkannt werden.

Zur Farbvertiefung wurde anschließend eine Diazotierung durchgeführt, wobei wir auf die Erfahrungen von *Unger* (23) zurückgriffen: Das Agarosegel wurde mit frisch angesetzter Natriumnitrit-Lösung (0,029 mol/l) überschichtet, daran anschließend in eine Lösung von Ammoniumamidosulfonat (0,044 mol/l) eingebracht und schließlich 25 ml einer Lösung von N-Naphthyl-(1)-ethylen-diammonium-dichlorid (0,1 mol/l) vorsichtig auf das Agarosegel aufgegossen. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die überstehende Flüssigkeit mit Filterpapier abgetupft. Das Farbreagens wurde jeweils frisch in 2 ml Dimethylsulfoxid gelöst und auf 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

## Ergebnisse

### Die Chromozym TH-spaltende Aktivität von menschlichem Serum

#### Serum von Blutspendern

Von 200 Blutspendern (100 Männer und 100 Frauen) im Alter zwischen 20 und 60 Jahren wurde im spontan geronnenem Serum die Chromozym TH-spaltende Aktivität gemessen und als Histogramm dargestellt (Abb. 1). Die angedeutete bimodale Verteilung hatte eine Spannweite von 658 bis 3983 U/l.

Die Aufteilung in Männer und Frauen ergab ähnliche Resultate:

Die Spannweite der Frauen umfaßt 799 bis 3983 U/l.

Das männliche Blutspender-Kollektiv zeigte eine Spannweite von 658 bis 2984 U/l.

Auf eine statistische Auswertung der Histogramme wurde bewußt verzichtet.

#### Chromozym TH-spaltende Aktivität im Serum von Patienten ohne Antikoagulantien-Behandlung

Die Chromozym TH-spaltende Aktivität in Seren von Patienten ohne Antikoagulantien-Behandlung ergab das Histogramm der Abbildung 2: Es überdeckt den Bereich von 258 bis 5158 U/l; Männer und Frauen zeigten keinen signifikanten Unterschied. In beiden Fällen liegen rechtsschiefe Verteilungen vor. Die Prüfung der Frage, ob im Bereich der oberen und unteren Extreme bestimmte Diagnosen, Zustände oder Symptome bei den Patienten gehäuft auftraten, ergab ein negatives Resultat. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen einem Zustand oder Krankheitsbild und der Chromozym TH-spaltenden Aktivität im Serum erkennen.

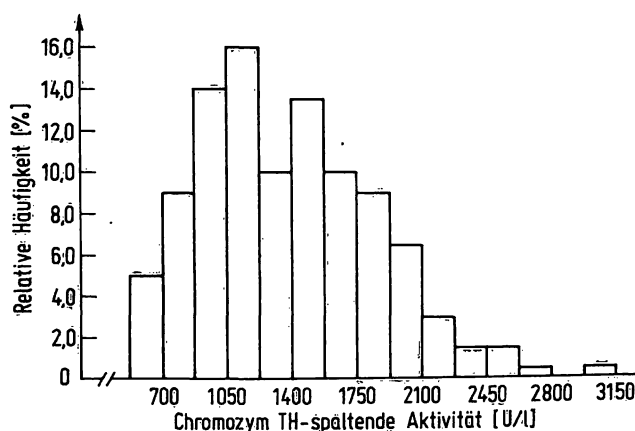


Abb. 1. Chromozym TH-spaltende Aktivität von menschlichem Serum, gemessen an einem Kollektiv von 200 Blutspendern (100 Männer und 100 Frauen).

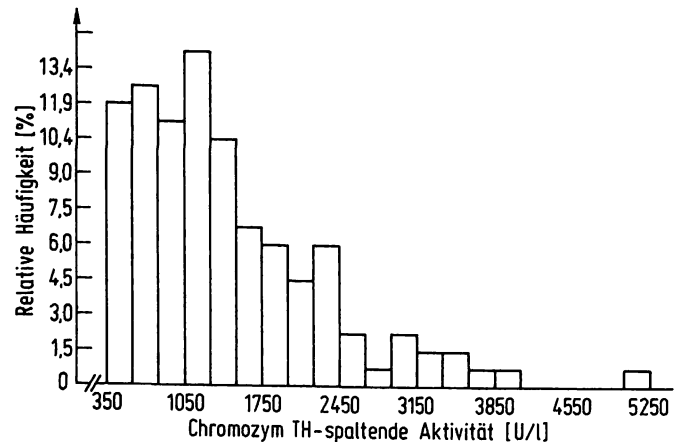


Abb. 2. Chromozym TH-spaltende Aktivität von menschlichem Serum, gemessen an 134 Patienten (ohne Antikoagulantien-Behandlung).

#### Chromozym TH-spaltende Aktivität in Seren von Patienten unter Antikoagulantien-Behandlung

Ein Kollektiv aus 23 Patienten, deren *Quick*-Werte zwischen 14 und 50 % lagen, zeigte eine Aktivität zwischen 35 und 470 U/l und lag damit offenbar weit niedriger als bei den Blutspendern oder den anderen Patienten. Es ließ sich jedoch keine hinreichende Korrelation zwischen Chromozym TH-spaltender Aktivität und individuellem *Quick*-Wert ermitteln (Abb. 3). Wurden die Patienten jedoch entsprechend ihren *Quick*-Werten in 4 Gruppen eingeteilt, so ergab sich die in Tabelle 1 wiedergegebene Beziehung. Offenbar kann durch grobe Klassifizierung ein Zusammenhang zwischen dem Resultat des *Quick*-Tests und der Chromozym TH-spaltenden Aktivität des Serums hergestellt werden.

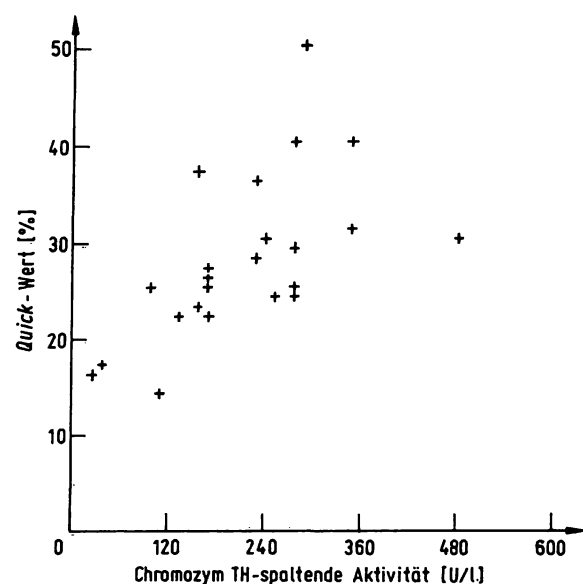


Abb. 3. Chromozym TH-spaltende Aktivität von menschlichem Serum, gemessen an Patientenserum (unter Antikoagulantien-Behandlung).

Tab. 1. Vergleich gruppierter *Quick*-Werte mit der Chromozym TH-spaltenden Aktivität im Serum.

n	<i>Quick</i> -Wert (%)	Chromozym TH-spaltende Aktivität (U/l)
5	10– 30	70– 153
5	30– 50	70– 341
5	50– 80	376– 776
5	80–110	423–1034

### Die individuelle Streuung der Chromozym TH-spaltenden Aktivität von menschlichem Serum

Von Patienten und von gesunden Probanden (Laborpersonal) wurde während 5 Tagen täglich unter Standardbedingungen Blut entnommen; der Gerinnungsvorgang verlief ebenfalls unter normierten Bedingungen (Glasgefäß, + 37°C, 30 min). Nach Abzentrifugieren wurde im überstehenden Serum die Chromozym TH-spaltende Aktivität bestimmt. Die Resultate in Tabelle 2 zeigen, daß beim gleichen Probanden von Tag zu Tag Schwankungen von 399 bis 2843 U/l beobachtet werden können.

Tab. 2. Chromozym TH-spaltende Aktivität im Serum von 6 Probanden, denen 5 Tage hintereinander Blut abgenommen worden war.

	Chromozym TH-spaltende Aktivität (U/l)				
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
Proband 1	2844	400	834	1005	586
Proband 2	3936	1340	1716	1551	1906
Proband 3	952	1492	1492	2280	1962
Proband 4	2526	1962	1833	1257	./.
Proband 5	470	1962	356	256	./.
Proband 6	1692	1422	1692	2714	./.

### Einfluß der Blutentnahme-Bedingungen

Die Schwankungen hängen offenbar mit den Bedingungen der Blutentnahme zusammen: Wurde außer der Metallkanüle zur Venenpunktion nur Plastikmaterial verwendet, so resultierten stets niedrigere Werte, als wenn Glas-/Metall-Spritzen zur Blutabnahme dienten und das entnommene Blut in ein Glasgefäß umgegossen wurde. Es gelang nicht, die Entnahme-Bedingungen so zu standardisieren, daß bei einem Probanden bei wiederholten Blutentnahmen am gleichen Tag etwa gleiche Aktivitäten im Serum gefunden wurden.

### Vergleiche der Chromozym TH-spaltenden Aktivität von Serum mit Thrombin

Da Chromozym TH vorzugsweise durch Thrombin enzymatisch gespalten wird, war es naheliegend, die Eigenschaften der Serumaktivität mit denen von Rinder- oder Humanthrombinpräparaten zu vergleichen.

- Eine Verdünnungsreihe, hergestellt von frisch gewonnenem Serum (in Triethanolamin-Puffer) ergab eine lineare Beziehung zwischen Verdünnungsgrad und Spaltungsgeschwindigkeit, wie es auch für Rinder- und Humanthrombin zutraf.
  - Die Lagerungsstabilität der Serumaktivität bei Raumtemperatur und bei + 4°C wurde über 5 Tage verfolgt und die Resultate in der Abbildung 4 dargestellt. Der gleiche Versuch mit Rinderthrombin (gelöst in Wasser und/oder in Albuminlösung) ist zum Vergleich wiedergegeben. Demnach ist die Stabilität der Thrombinpräparate deutlich niedriger als die Chromozym TH-spaltende Aktivität von Humanserum.
  - Zusatz von Aprotinin (400 KIE/Ansatz) hat keine Wirkung auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Rinderthrombin oder von Humanserum.
- Orientierend wurden noch jeweils in 10<sup>-3</sup> mol/l Endkonzentration die folgenden Zusätze geprüft: Cystein, Ascorbinsäure, Oxalat, Spermin, EDTA, Magnesium- und Calcium-Ionen. Alle geprüften Zusätze hatten keinen Effekt auf die Substratspaltung durch Thrombin und/oder durch Serum.
- Ein Gemisch von Seren verschiedener Versuchspersonen mit unterschiedlichen Spaltungsaktivitäten ergab eine der Mischung entsprechende Gesamtaktivität, d.h. die Spaltungsaktivität wird wahrscheinlich nicht durch Hemmfaktoren beeinflusst.
  - Durch Bariumsulfat oder Aluminiumhydroxid kann Thrombin sowohl aus wäßrigen als auch aus Albumin-

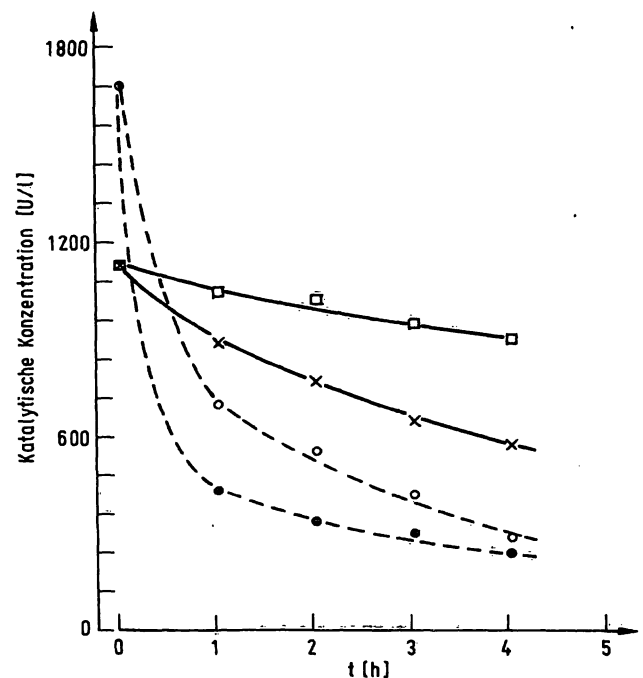


Abb. 4. Die Lagerungsstabilität von Thrombin im Vergleich zu Serum, gemessen an der Chromozym TH-spaltenden Aktivität.

□—□ Serum + 4°C      ×—× Serum + 22°C  
○---○ Thrombin + 4°C    ●---● Thrombin + 22°C



# Das Photometer mit Gedächtnis: PCP 6121

**Einfacher,  
schneller, sicherer durch  
Computer-Technik  
mit Universal-Tastatur.**

Machen Sie mit Eppendorf den Schritt nach vorn. Reduzieren Sie den Zeitaufwand in Ihrem Labor. Schließen Sie Fehlermöglichkeiten aus. Verbessern Sie die Analysen-Qualität.

**Der entscheidende Fortschritt:**

1. Sie können Ihre individuellen Daten von 24 Methoden speichern. Das machen Sie nur einmal. Ändert sich Ihr Programm, sind die neuen Daten im Handumdrehen eingegeben.

2. Sie müssen zum Methodenwechsel nur noch zwei Tasten drücken. Berechnungsfaktor, Kinetikmeßzeit oder Standardkonzentration sind dann programmiert. Keine umständlichen Eingaben mehr und keine Verwechslungen.

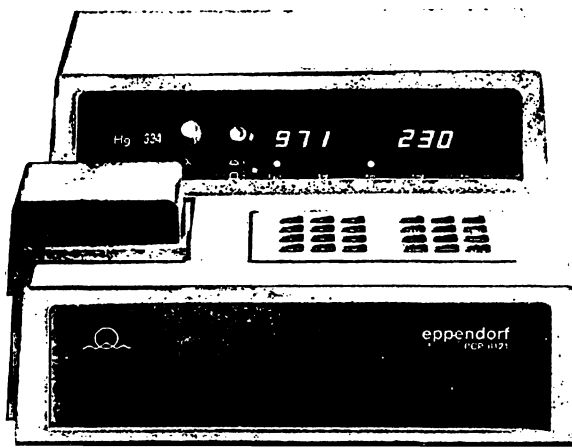
3. Sie brauchen nichts mehr abzugleichen. Das erledigt der Mikroprozessor für Sie. Er macht den Nullabgleich. Er sucht den optimalen Meßbereich. Besser und schneller als Sie es selbst können.

4. Sie sind von allem Prüf- und Kontrollaufwand befreit. Der Mini-Computer vergleicht die Kontrollzahlen zur Linearitätskontrolle und macht die Standard-Mittelwertbildung für Sie. Er schützt Sie vor falschen Ergebnissen.

**Und noch etwas sollten Sie wissen:**

Zum PCP 6121 gehört das Eppendorf-System zur Probenaufbereitung. Beides ist aufeinander abgestimmt und bietet Ihnen ein Optimum an Rationalisierung und dient Ihrer Qualitätsverbesserung.

**der Schritt nach vorn  
eppendorf**



**Eppendorf Gerätebau  
Netheler + Hinz GmbH  
Postfach 630324  
2000 Hamburg 63**

☐ Ich bin interessiert und bitte um ☐ Informations-  
☐ Vorführung durch den Fachhandel

Ort: \_\_\_\_\_  
Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH

**S. B. Pal**  
(Editor)

## **Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs**

Proceedings of the International Symposium on Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, Ulm, West Germany, July 10 and 11, 1978.

1978. 17 cm x 24 cm. XXVI, 475 pages. Numerous illustrations.  
Hard cover DM 130,-; \$ 68.50 ISBN 3 11 007539 3

Over the past three decades, there has been tremendous progress in the discovery and development of analytical methods for the quantitative determination of minute amounts of various substances in biological samples.

The introduction of competitive protein binding technique and radioimmunoassay have made it possible to measure many hormones and drugs at extremely low concentrations, thus opening a new avenue of sensitive assays.

As these techniques involve the use of radioactive isotopes, analytical laboratories allied to medicine are faced with a serious health hazard.

Enzyme immunoassay has essentially solved this problem because no radiation hazard or disposal difficulties are involved as this procedure is free from the use of radioactive isotopes.

Enzyme immunoassay methods are specific and sensitive, some of these procedures being as sensitive as radioimmunoassay. The laboratory equipment required is relatively inexpensive, readily available, and the reagents are reasonably priced and have a long shelf life. Technical manipulations are simple and the assays may be very rapid, as separation steps are not generally required.

The variety of labels available may allow multiple simultaneous assays to be performed and it appears that there is a potential for automating the enzyme immunoassay methods.

The aim of holding this International Symposium on Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, was to invite a number of speakers from various countries who are working in this rapidly developing field, and to have an opportunity to listen to their experiences with this technique; also, to discuss the possibility of further developments.

Prices are subject to change without notice

haltigen Lösungen durch Adsorption quantitativ entfernt werden. Im Gegensatz dazu erwiesen sich beide Adsorbentien völlig unwirksam gegenüber der Chromozym TH-spaltenden Aktivität von Serum. Weder durch Variation des Puffers, des pH-Wertes oder der Ionenstärke gelang es, meßbare Mengen der Serumaktivität zu adsorbieren.

- f) Der Einfluß von Antithrombin III mit oder ohne Zusatz von Heparin auf Thrombinlösungen entsprach den Erwartungen: Ein Thrombin-Testansatz von 1527 U/l sank auf 329 U/l bei Inkubation mit Citratplasma (30 min bei 37°C). Dabei war es gleichgültig, ob das Thrombin in reinem Wasser oder in Gegenwart von Albumin gelöst vorlag.
- g) Wurde dem Thrombin-Testansatz neben Plasma zusätzlich noch 30 USP-E/l Heparin zugesetzt, so verlor er nach 15 min Inkubation bei 37°C seine Spaltungsaktivität vollständig. Erst ab 15 USP-E/l konnte eine geringe Aktivität gemessen werden.
- h) Wurde dagegen an Stelle von Thrombin Serum eingesetzt, so konnte die Chromozym TH-spaltende Aktivität weder durch Plasma noch durch Heparin bis zu 950 USP-E/l gehemmt werden. Dies gilt sowohl für den Fall, daß Serum und Plasma von der gleichen Versuchsperson gewonnen waren, als auch dann, wenn Serum und Plasma von verschiedenen Personen stammten. Daraus folgt, daß die Serumaktivität unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht durch Antithrombin III beeinflusst werden kann.
- i) Die Aktivität hinsichtlich der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin wurde in folgender Weise geprüft: Zusatz von Thrombin führt bei Citratplasma und/oder gereinigter Rinderfibrinogenlösung (5g/l) rasch zu einer Gerinnung, wobei die Zeit bis zum Gerinnungseintritt von der zugesetzten Thrombinmenge abhängt (Abb. 5). Die Chromozym TH-spaltenden Aktivitäten im Serum führten dagegen im gesamten Beobachtungsbereich nicht zu einer Gerinnung des Fibrinogens, auch dann nicht, wenn bis zu 60 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Chromozym TH-spaltende Aktivität des Serums hat also keine Thrombin-ähnliche Wirkung gegenüber Fibrinogen.
- k) Im Vergleich zu Chromozym TH wurden neun andere Substrate unter streng identischen Bedingungen auf ihre Spaltbarkeit durch Humanserum untersucht. Die Ergebnisse, gemessen an einer Serum-Probe mit relativ hoher Aktivität gegenüber Chromozym TH sind in der Tabelle 3 wiedergegeben.
- l) Bestimmung der *Michaelis*-Konstante für die Chromozym TH-spaltende Aktivität von Serum im Vergleich zu Humanthrombin: Ein Humanserum mit der Aktivität 1140 U/l wurde mit einer Substratverdünnung von 1,5 mmol/l bis zu 0,25 mmol/l absteigend inkubiert und die Anfangsgeschwindigkeiten unter den be-

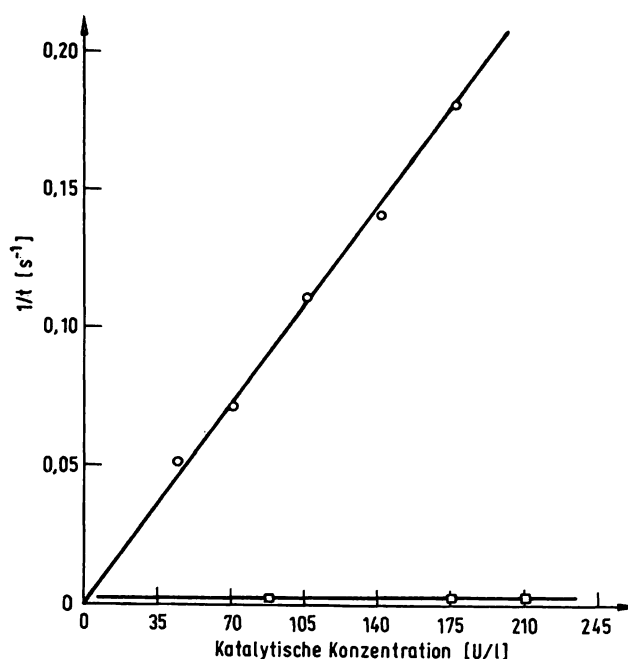


Abb. 5. Die Wirkung von Thrombin, respektive Serum auf die Fibrinogenspaltung, gemessen am Zeitpunkt des Gerinnungseintritts.

○—○ = Thrombin      □—□ = Serum

Tab. 3. Spaltungs-Aktivität eines Humanserums gegenüber Chromozym TH und 9 anderen chromogenen Substraten<sup>1)</sup> ohne und mit Aprotinin-Zusatz.

	Ursprüngliche Aktivität in U/l	Aktivität nach Zusatz von 400 KIE Aprotinin pro Ansatz in U/l
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	3571	3367
H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S 2251)	< 10	< 10
Bz-Phe-Val-Arg-pNA (S 2160)	11,3	< 10
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S 2238)	3842	2133
Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S 2222)	22,6	22,5
Tos-Gly-Pro-Lys-pNA	1062	949
Bz-Pro-Phe-Arg-pNA	< 10	< 10
H-D-Val-Gly-Arg-pNA	249	192
Bz-Arg-pNA	< 10	< 10
Cbz-Gly-Pro-Arg-pNA	1351	1277

schriebenen Standardbedingungen gemessen. In analoger Weise wurde ein Humanthrombin-Präparat von 1175 U/l behandelt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 6 wiedergegeben. Der *Lineweaver-Burk*-Plot zeigt für das verwendete Humanthrombin-Präparat einen  $K_m$ -Wert von 17,5 µmol/l, für das Humanserum jedoch 31,25 µmol/l.

Die Substrataffinität des Serums ist also deutlich niedriger als die des gereinigten Humanthrombin-Präparates.

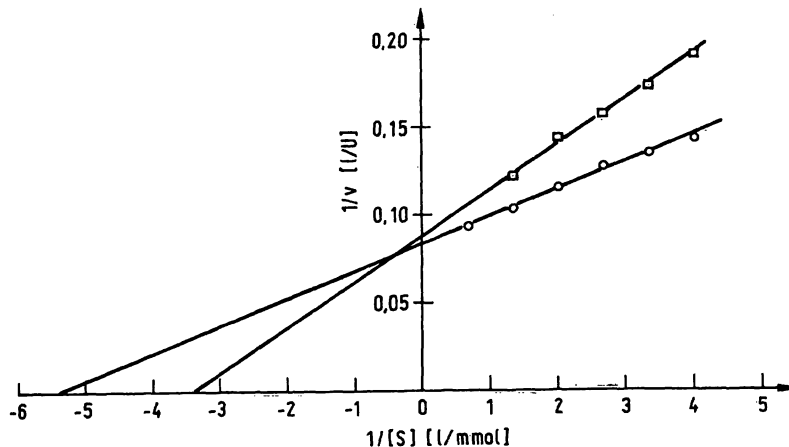


Abb. 6. Lineweaver-Burk-Darstellung von  $K_m$  von Humanthrombin im Vergleich zu Serum für Chromozym TH als Substrat, verdünnt in Triethanolamin-Puffer.  $\circ$ — $\circ$  = Humanthrombin ( $K_m = 17,5 \mu\text{mol/l}$ )  $\square$ — $\square$  = Serum ( $K_m = 31,25 \mu\text{mol/l}$ )

### Identifikation der gerrinnungsabhängigen Serum-Protease-Aktivität

#### Elektrophoretische Trennung und Visualisierung der Serum-Protease-Aktivität

Die Abbildung 7 zeigt neun verschiedene Serumproben, die von 4 gesunden Probanden und 5 Patienten mit verschiedenen Diagnosen stammen. Man ersieht daraus, daß in jedem Fall an charakteristischer Stelle, etwa im Bereich der  $\alpha_2$ -Globulinfraktion, eine enzymatisch aktive Bande auftritt. Bei einzelnen Seren sind andeutungsweise noch eine oder zwei Fraktionen in anderen Positionen zu erkennen, die wesentliche Chromozym TH-spaltende Aktivität liegt aber in einer einheitlichen Position. Im Gegensatz dazu gibt das Humanthrombin keine einheitliche Trennung, seine Position deckt sich nicht mit der Chromozym TH-spaltenden Aktivität von Serum.

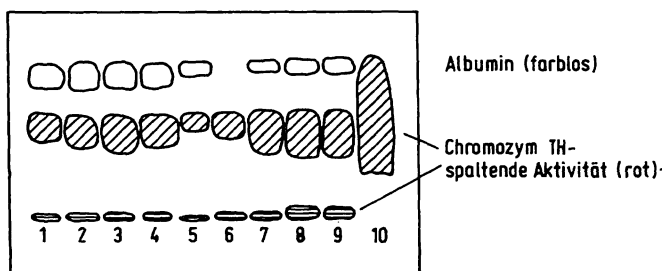


Abb. 7. Elektrophoretische Trennung der Chromozym TH-spaltenden Aktivität von 9 Serumproben und 1 Präparat von Humanthrombin.

- 1 = Blutspender 1046 U/l
- 2 = Blutspender 1128 U/l
- 3 = Blutspender 1093 U/l
- 4 = Blutspender 846 U/l
- 5 = Pancytopenie bei Autoimmunerkrankung 94 U/l
- 6 = Hepatitis 388 U/l
- 7 = Cholelithiasis 2714 U/l
- 8 = Bronchial-Ca 3748 U/l
- 9 = Terminale Uraemie 3290 U/l
- 10 = Humanthrombin

### Identifikation der Chromozym TH-spaltenden Aktivität des Serums mittels Immunpräzipitation

Wurde einem Aliquot Serum eine gleiche Menge anti- $\alpha_2$ -Makroglobulin zugefügt und das Gemisch 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, so entstand eine makroskopisch deutlich erkennbare Trübung. Nach Zentrifugation konnte im Überstand nur noch eine geringe Menge an Chromozym TH-spaltender Aktivität bestimmt werden. Dabei wurde berücksichtigt, daß auch das tierische Antiserum eine gewisse Chromozym TH-spaltende Aktivität besaß, die naturgemäß nicht ausgefällt wurde. Zur Überprüfung der Spezifität dieses Versuches wurden analoge Fällungen mit anti-Haptoglobin-Serum, anti-Transferrin-Serum, anti-IgA-Serum, anti- $\alpha_1$ -Antitrypsin-Serum und anti-Prothrombin-Serum durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Chromozym TH-spaltende Aktivität nur mit dem Antiserum gegen  $\alpha_2$ -Makroglobulin präzipitiert werden konnte.

### Diskussion der Ergebnisse

Die Beobachtung, daß im menschlichen Serum stets relativ hohe Protease-Aktivitäten vorhanden sind, von denen das Tripeptid Tos-Gly-Pro-Arg-pNA gespalten wird, war überraschend. Den Mitteilungen von Roka (24) war zu entnehmen, daß im Citratplasma und im Serum von Patienten mit Leber-Erkrankungen proteolytische, gegen Chromozym TH gerichtete Aktivitäten gefunden werden. Daß sich aber regelmäßig im Serum von Gesunden und Kranken relativ hohe spezifische Protease-Aktivitäten finden, ist offenbar nicht untersucht worden. Die Spezifität gegenüber dem geprüften Tosyltri-peptid ist in Tabelle 3 im Vergleich zu ähnlichen, chromogenen Substraten wiedergegeben. Unger & Struck (25) haben mit 19 verschiedenen p-Nitroaniliden von Aminosäuren, Acylaminosäuren, Dipeptiden und Acyldipeptiden nur sehr geringe Hydrolyseaktivitäten in menschlichen Seren gefunden.



Andererseits ist es in orientierenden Untersuchungen an Patientenserum nicht gelungen, einen Hinweis auf eine mögliche diagnostische Relevanz dieser Serumprotease-Aktivitäten zu finden.

Die Häufigkeitsverteilung der Amidaseaktivität im Serum ähnelt jener, die Witt (26) als Häufigkeitsverteilung der Prothrombinwerte bei Normalpersonen (*Quick*-Wert 100% oder < 100%) gefunden hat, obwohl die Kurven unter völlig anderen Bedingungen gewonnen wurden. Ihre Feststellung, daß der Vergleich von *Quick*-Werten mit Protease-Aktivitäten zu widersprüchlichen Ergebnissen führt, traf auch auf die Serumaktivität zu. Zwar zeigten die unter Antikoagulantien stehenden Patienten im Serum niedrigere Protease-Aktivitäten, doch war keine befriedigende Korrelation zu gewinnen. Deshalb wurde weder die Regressionsgerade noch der Korrelationskoeffizient berechnet.

Ungeklärt ist vorläufig der Einfluß des Kontaktsystems (27).

Nach Angaben in der Literatur (28) gilt die hohe Spaltungs-Spezifität von Thrombin (neben anderen Arginin-abhängigen Proteasen, d. h. Trypsin, Plasmin und Kallikrein) gegenüber Chromozym TH als gesichert. Durch Zusatz von Aprotinin kann der Einfluß der anderen Proteasen unterdrückt werden. Demnach mußte die Serumaktivität entweder Thrombin entsprechen oder es handelte sich um einen anderen, mit Thrombin nicht identischen „Faktor“.

Von Thrombin unterschiedlich ist die Serumaktivität in den folgenden 5 Punkten:

1. Im Gegensatz zu Thrombin kann die Serumaktivität nicht durch Antithrombin III (das in jedem normalen Plasma vorliegt) gehemmt werden, auch dann nicht, wenn gleichzeitig Heparin zugegeben wird.
2. Während Thrombin von Bariumsulfat und/oder Aluminiumhydroxid adsorbiert wird, trifft dies auf die Serumaktivität nicht zu. Dies ist auch schon von Roka (29) beobachtet worden.
3. Auffallend ist auch die weit höhere Lagerungsstabilität der Serumaktivität im Vergleich zu Thrombin.
4. Wichtigster Unterschied ist jedoch, daß die Serumaktivität nicht in der Lage ist, Fibrinogen in Fibrin zu überführen. Offenbar wird durch die Serumaktivität das große Fibrinogenmolekül nicht gespalten, wohl aber das kleine Chromozym TH-Molekül.
5. Schließlich stimmt die elektrophoretische Wanderung der Serumaktivität nicht befriedigend mit den geprüften Humanthrombin-Präparaten überein. Allerdings ist die genaue Zusammensetzung des käuflichen Thrombinpräparates nicht bekannt. Da Thrombin bekanntlich (30) in „multiple forms“ auftritt, die sich in Molekulargewicht und enzymatischer Aktivität unterscheiden, ist ein nicht näher identifiziertes käufliches Präparat zu Vergleichszwecken wenig geeignet.

6. Die  $K_m$ -Werte zwischen Serum- und Humanthrombin differieren deutlich, die Serumaffinität zu Chromozym TH ist nur etwa halb so groß wie die von Thrombin.

Die Erkenntnis, daß es sich bei der Chromozym TH-spaltenden Aktivität des Serums um einen Komplex aus Thrombin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin handelt, ist nicht grundsätzlich neu. Barret & Starkey (31) haben gezeigt, daß  $\alpha_2$ -Makroglobulin die Fähigkeit hat, Serinproteasen zu binden, nicht jedoch andere Enzyme oder enzymatisch inaktive Vorstufen der Proteasen. Es ist charakteristisch, daß die Enzymmoleküle in gebundenem Zustand in der Lage sind, mit Substraten und Inhibitoren von niedrigem Molekulargewicht zu reagieren, nicht jedoch mit solchen von hohem Molekulargewicht. Die Autoren haben diese Bindungswirksamkeit an Trypsin, Chymotrypsin, Kathepsin, Papain und anderem untersucht, Iwamoto et. al. (32) an Antiplasmin. Lanchantin et al. (33) haben gefunden, daß die esterspaltenden Eigenschaften von Thrombin durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin nicht, die Fibrinogenspaltung dagegen gehemmt wird. Demnach verhalten sich beide (nicht identische) aktive Zentren des Thrombinmoleküls bei der Bindung an  $\alpha_2$ -Makroglobulin übereinstimmend. Auch Harpel (34) vertritt die Annahme, das aktive Zentrum der Serinproteasen im  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Enzymkomplex bleibe hinsichtlich des katalytischen Potentials gegenüber kleinemolekularen Substraten voll erhalten, während die Hydrolyse der natürlichen Proteinsubstrate sterisch gehindert wird.

Es bleibt die Frage offen, warum die Wirksamkeit des Thrombin- $\alpha_2$ -Makroglobulin-Komplexes nicht auch im Plasma an der Chromozym TH-Spaltung nachgewiesen werden kann. Als Erklärung liegt die Annahme nahe, daß Komplexe dieser Art von den zellulären Bestandteilen des Blutes, insbesondere von den Makrophagen rasch aufgenommen werden, ein Prozeß, der eine zweite Stufe von Eliminationsvorgängen im menschlichen Blut darstellen könnte. Die Frage, ob in der Blutbahn auftretendes Thrombin auf zwei (unabhängigen?) Wegen eliminiert wird, nämlich durch den Antithrombin-Heparin-Cofactor-Mechanismus (35) und andererseits durch Bindung an  $\alpha_2$ -Makroglobulin, bedarf noch weiterer experimenteller Prüfung.

## Danksagung

Die Autoren danken:

Herrn Dr. L. Svendsen, Pentapharm AG, Basel, für wertvolle Anregungen und Diskussionen;  
Herrn Dr. H. J. Schlegel, Boehringer Mannheim (Schweiz) AG, Cham, für die großzügige Überlassung von Substraten;  
Herrn P. Bugglin, Globopharm AG, Küsnacht/ZH, für Substrate und wertvolle Literaturhinweise.

## Literatur

1. Svendsen, L., Blombäck, B., Blombäck, M. & Olsson, P. (1972), *Thromb. Res.* 1, 267–278.
2. Bergström, K. & Blombäck, M. (1974), *Thromb. Res.* 4, 719–729.
3. Axelsson, G., Korsan-Bengtson, K. & Waldenström, J. (1976), *Thromb. Haemostasis*, 36, 517–524.
4. Bergström, K. & Egberg, N., Abstracts 2nd Europ. Congre. Clin. Chem. Prague, October 1976.
5. Latallo, Z. S. & Teissyre, E. (1977), in *l.c.* (21), 181–192.
6. Vinazzer, H. (1977), in *l.c.* (21), 203–209.
7. Aurell, L., Friberger, P., Karlsson, G. & Claeson, G. (1977), *Thromb. Res.* 11, 595–609.
8. Claeson, G. & Friberger, P. (1977), zit. nach *l.c.* (17).
9. Amundsen, E., Svendsen, L., Vennerød, M. & Laake, K. (1974), in "Chemistry and Biology of the Kallikrein-kinin System in Health and Disease", (Pisano, J. J. & Austen, K. F. eds.) DHEW Publ. No. (NIH), 76–791.
10. Fässler, H., Walter, M., Marbert, G. & Duckert, F. (1977), in *l.c.* (21), 240–250.
11. Ødegard, O. R., Lie, M. & Abildgaard, U. (1975), *Thromb. Res.* 6, 287–294.
12. Ødegard, O. R. (1975), *Thromb. Res.* 7, 351–360.
13. Teien, A. N., Lie, M. & Abildgaard, U. (1976), *Thromb. Res.* 8, 413–416.
14. Blombäck, M., Blombäck, B., Olsson, P. & Svendsen, L. (1974), *Thromb. Res.* 5, 621–632.
15. Vinazzer, H. (1975), *Haemostasis*, 4, 101–109.
16. Abildgaard, U., Lie, M. & Ødegard, O. R. (1976), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36, 109–112.
17. Gyzander, E., Friberger, P., Myrwold, H., Noppa, H., Olsson, P., Teger-Nielsson, A.-C. & Wallmo, L. (1977), in *l.c.*, (21), 229–245.
18. Seghatchian, M. J. & Miller-Andersson, M. WHF Proceeding, Kyoto, September 1976.
19. Seghatchian, M. J. & Miller-Andersson, M. (1976), *Proc. Symp. on synthetic substrates and inhibitors of coagulation and fibrinolysis*, Kyoto, September 1976.
20. Scully, M. F. & Kakkar, V. V. (1977), *Clin. Chim. Acta* 79, 595–602.
21. Witt, I., (ed.) (1977), *New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates*. Proc. Sympos. Dtsch. Ges. Klin. Chem. Titisee July 76 W. de Gruyter Verlag, Berlin.
22. Duckert, F., Witt, I. & Svendsen, L. *Chromogene Substrate in der Gerinnungsanalytik*. Boehringer Mannheim Druckschrift 1976.
23. Unger, T. & Struck, H. (1976), *diese Z.* 14, 449–452.
24. Roka, L., Koch, R. & Bleyl, H. (1977), in *l.c.* (21), 171–180.
25. Unger, T. & Struck, H. (1977), *Clin. Chim. Acta* 78, 113–120.
26. Witt, I. (1977), in *l.c.* (21), 155–168.
27. Nossel, H. L. (1976) in: *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis* (Biggs, R. ed.) 2nd ed. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
28. Claeson, G., Aurell, L., Karlsson, G. & Friberger, P. (1977), in *l.c.* (21), 37–48.
29. Roka, L. (1977), in *l.c.* (21), 197.
30. Lundblad, R. L., Kingdon, H. S. & Mann, K. G. (1976), *Meth. Enzymol.*, Vol. XLV, 156–176, (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.) Academic Press, New York.
31. Barret, A. J. & Starkey, P. M. (1973), *Biochem. J.* 133, 709–724.
32. Iwamoto, M. & Abiko, Y. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, 214, 402–410.
33. Lanchantin, G. F., Plesset, M. L., Friedmann, J. A. & Hart, D. W. (1966), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 444–449.
34. Harpel, P. C. (1976), *Meth. Enzymol.*, Vol. XLV, 639–652, (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.) Academic Press, New York.
35. Damus, P. S. & Rosenberg, R. D. (1976), *Meth. Enzymol.* Vol. XLV, 653–669, (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.), Academic Press, New York.
36. Svendsen, L. & Stocker, K. (1977), in *l.c.* (21), 23–35.

Prof. Dr. Dr. H. Keller  
 Institut für Klin. Chemie  
 und Haematologie des Kantons  
 Frobergstr. 3  
 CH-9000 St. Gallen